Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. A. Bohle

GLOMERULÄRE VERÄNDERUNGEN BEIM KANINCHEN WÄHREND DER BEHANDLUNG MIT MC–RINDERINSULIN UND DESSEN HOCHMOLEKULAREN VERUNREINIGUNGEN EINE QUANTITATIV–MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dr. med. Hans Thomas Eiche
aus Stuttgart–Degerloch

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549624_0081

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. A. Bohle

GLOMERULÄRE VERÄNDERUNGEN BEIM KANINCHEN WÄHREND DER BEHANDLUNG MIT MC–RINDERINSULIN UND DESSEN HOCHMOLEKULAREN VERUNREINIGUNGEN EINE QUANTITATIV–MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dr. med. Hans Thomas Eiche
aus Stuttgart–Degerloch

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. med. Helmut Haselmann
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. Herbert Wehner
	(Professor Dr. med. Adalbert Bohle)
2. Berichterstatter:	Professor Dr. rer. nat. Dr. med. Horst Ritter

Gedruckt bei Fa. H.-J. Köhler, Reprografischer Betrieb, Vor dem Kreuzberg 25, 7400 Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Material und Methodik	2 - 5
3. Ergebnisse	6 - 9
4. Diskussion	1o - 22
5. Literaturverzeichnis	23 - 28
6. Anhang (Tabellen 1 - 3, Diagramme)	29 - 39
7. Lebenslauf	4o

1. Einleitung

Mit der Entdeckung des Insulins durch BANTING und BEST im Jahre1921 ist die dem Diabetes mellitus zugrunde liegende Stoffwechselstörung behandelbar geworden, nicht jedoch die sog. Komplikationen des Diabetes mellitus wie die diabetische Glomerulosklerose KIMMELSTIEL-WILSON oder die diabetische Retinopathie. Als Ursache für diese Erkrankungen werden die diabetische Stoffwechsellage (ØSTERBY 72,73; BLOODWORTH et al. 73), eine genetisch fixierte Disposition (SIPERSTEIN et al. 68; SALAZAR et al. 73) und immunologische Prozesse, hervorgerufen möglicherweise durch exogenes oder abnormes endogenes Insulin (BURKHOLDER 68; WEHNER et al. 7o,73,77; FUCHS et al. 73), angesehen.

Der letztgenannte Aspekt der Pathogenese der diabetischen Mikroangiopathie gewann besondere Bedeutung, nachdem es SCHLICHTKRULL 1969 gelang, kristallines Insulin in drei Komponenten aufzuspalten (a-, b- und c-Komponente), wobei die c-Komponente das "reine" Insulin darstellte, dem keinerlei immunogene Eigenschaften zugeschrieben wurden. Die a- bzw. die b-Komponente, bei denen es sich um hochmolekulare Verunreinigungen wie Proinsulin, Dimer- und Intermediärinsulin handelt, hatten eine deutliche Antikörperbildung zur Folge. (SCHLICHTKRULL 7o,72,78)

Durch unsere Versuche an Kaninchen soll geklärt werden, ob glomeruläre Veränderungen an der Kaninchenniere im Sinne einer diabetischen Glomerulosklerose durch Immunisierung mit Insulinpräparationen verschiedener Zusammensetzung hervorgerufen werden können, oder ob sich mit morphometrischen Methoden überhaupt Veränderungen der glomerulären Strukturen nachweisen lassen. In vorangegangenen Untersuchungen (WEHNER et al. 73,77) waren bei ähnlichem Versuchsaufbau mit quantitativ morphologischen Verfahren glomeruläre Läsionen beschrieben worden, deren Schweregrad mit der Antigenität der verwendeten Substanzen direkt korreliert schien.

2. Material und Methodik

2.1. Versuchstiere

Verwendet wurden insgesamt 41 ausgewachsene männliche Kaninchen im Alter von 4 - 5 Monaten (Belgische Riesen, Schecken). Diese 41 Tiere verteilten sich auf drei Versuchsgruppen:

2.1.1. MC-Rinderinsulin-Gruppe: In diese Gruppe gehörten 13 Tiere. Sie erhielten dreimal wöchentlich 2o E MC-Rinderinsulin subcutan in die Nackenregion injiziert. Freund'sches Adjuvant wurde nicht verwendet. 4 Tiere wurden nach 3o, 5 Tiere nach 6o und weitere 4 Tiere nach 9o Tagen getötet.

2.1.2. Proinsulin-Gruppe: Dieser Gruppe gehörten 15 Tiere an, von denen je 5 nach 3o, 6o und 9o Tagen getötet wurden. Sie erhielten bis zu ihrer Tötung o,5 ml einer Proinsulinpräparation vom Rind (1,6 mg/ml) subcutan in die Nackenregion injiziert, auch hier ohne Freund'sches Adjuvant. Die Injektion erfolgte dreimal wöchentlich.

2.1.3. a/b-Komponenten-Gruppe: Dazu gehörten 13 Tiere, von denen je 5 nach 3o und 6o Tagen und die restlichen 3 nach 9o Tagen getötet wurden. Sie erhielten dreimal wöchentlich o,8 mg a/b-Komponente in die Nackenregion injiziert, ohne Verwendung von Freund'schem Adjuvant.

Alle Tiere hatten freien Zugang zu 5%iger Glucoselösung (zur Vermeidung hypoglykämischer Zustände) und Nahrung (Altromin-Standard).

Als Kontrolle dienten die Nierenpräparate unbehandelter Tiere aus einem vorangegangenen Versuch. Ausgewertet wurden 4 Tiere.

2.2. Insulinpräparationen

2.2.1. MC-Rinderinsulin

Hier handelt es sich um ein Monokomponent-Insulin aus Rinderpankreas in neutraler Lösung. Die Aktivität entsprach 4o IE/ml Lösung. (Batch 4874)

2.2.2. Proinsulin

Hier handelt es sich um eine Proinsulinpräparation aus Rinderpankreas in saurer Lösung. Sie enthielt 1,6 mg Proinsulin / ml Lösung. (Batch 1975)

2.2.3. a/b-Komponente

Diese Lösung besteht aus Teilfraktionen, die man bei der Reindarstellung kristallinen Rinderinsulins erhält (Reindarstellung erfolgte mittels Gelfiltration auf Sephadex G-5o und anschliessender Ionenaustauschchromatographie). Die a-Komponente enthält zahlreiche Proteine mit Molgewichten grösser als 12 ooo (Durchschnitt 25 ooo), deren Struktur und Herkunft bisher praktisch ungeklärt sind. Sie konnte inzwischen in weitere Subfraktionen a1,a2 und a3 durch Chromatographie aufgespalten werden; alle diese Subfraktionen enthalten o,1 - 2,o % Proinsulin und 1,o - 9,o % Insulin. Die b-Komponente setzt sich zusammen aus Proteinen mit einem Molgewicht zwischen 6 ooo und 12 ooo; zu ihnen gehören Proinsulin, Intermediär- und Dimerinsulin.

Im Versuchstier zeigte diese Lösung eine Insulinaktivität von 6 - 8 IE/ml Lösung.

(Alle im Versuch verwendeten Insulinpräparationen wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr,J.Schlichtkrull, Novo Forschungsinstitut Kopenhagen,Dänemark, zur Verfügung gestellt.)

2.3. Histologische Methode

Die Nieren der Versuchstiere wurden sofort postmortal für 24 Stunden in gepufferter 4%iger Formalinlösung fixiert, 2 Stunden in ge-

pufferter 2%iger Osmiumsäure nachfixiert und in Methacrylat eingebettet. Dünnschnitte von o,5 - 1,o u Schnittdicke wurden nach Movat versilbert (WEHNER 7o).

2.4. Histometrische Methoden

Die morphometrische Auswertung wurde als Blindstudie durchgeführt, d.h. der Untersucher wusste nicht, zu welcher Versuchsgruppe das auszuwertende Präparat gehörte. Erst nach Beendigung der Auswertung erfolgte die Zuordnung zu den einzelnen Versuchsgruppen.

Pro Tier wurden 2o Glomeruli ausgewertet. Die Durchführung erfolgte an einem Visopan-Reichert mit Halogenlampe, das sich als ausreichend lichtstark und auch bei grosser Vergrösserung ausreichend scharfzeichnend erwies. Im Einzelnen wurde bestimmt:

- im Punktzählverfahren (Objektiv Plan 63/o,8o, 16o/o,17, Punktabstand 6u) die glomeruläre Anschnittsfläche (μ^2), die angeschnittene mesangiale Fläche (μ^2) und der daraus resultierende prozentuale Anteil des Mesangiums an der Glomerulusfläche, wobei die Glomerulusfläche der Fläche entspricht, die durch die Bowman'sche Membran begrenzt wird.

- durch direkte Kernzählung und -differenzierung die Gesamtzahl der im Glomerulus angetroffenen Zellen und die der verschiedenen glomerulären Zelltypen (Endothel-, Deck- und Mesangiumzellen) sowie die sich daraus ergebende prozentuale Verteilung.
  Die dafür verwendete Vergrösserung am Visopan-Reichert war : 1oo/1,25, 16o/o,17 Ölimmersion. Um eine Doppelzählung zu vermeiden wurden bereits gezählte und zugeordnete Zellen mit abwaschbarem Filzstift auf der Glasplatte des Visopan mit drei unterschiedlichen Zeichen markiert.

- die glomeruläre Zelldichte als Zellzahl / 1ooo μ^2 angeschnittener Glomerulusfläche.

- die mesangiale Zelldichte als Mesangiumzellen / 1oo μ^2 der bestimmten Mesangiumfläche.

2.5. Antikörperbestimmung

Bestimmt wurden neben den Antikörperntitern gegen Rinderinsulin und a-Komponente die Ak-Titer gegen Schweine-PP (PP= pancreatic polypeptide). Dieses pancreatic polypeptide ist ein Polypeptid aus 36 Aminosäuren inzwischen analysierter Sequenz, das aus dem Pankreas isoliert wurde. Es zirkuliert im Kreislauf und Nahrungsaufnahme bewirkt schnell ansteigende Serum-PP-Werte. Weiterhin wurde die Lokalisation dieses Polypeptids in einer speziellen Zellgruppe des endokrinen Pankreas gesichert. Die physiologische Rolle des PP ist noch unbekannt, eine hormonartige Wirkung jedoch wahrscheinlich. Als Verunreinigung ist PP in Insulinpräparationen vorhanden. (SUNDLER, HAKANSON, LARSSON 77; HEDING, pers. Mitteilung 78)

Zur Bestimmung der genannten Ak-Titer wurde das 1973 von CHRISTIANSEN veröffentlichte Verfahren mittels Radioimmunoelektrophorese angewendet. Die Ergebnisse dieser Bestimmungsmethode bedürfen der Korrektur um den unspezifischen Anteil der Antikörperbindung, der bei Rinderinsulin o,o5 mU/ml, bei Schweine-PP 1,o ng/ml und bei der a-Komponente 25,o ng/ml beträgt. Nur Ergebnisse, die über diesen genannten Werten liegen, dürfen als positiv angesehen werden. Zu den Werten der Antikörper gegen die a-Komponente muss zusätzlich gesagt werden, dass sie keine absoluten Werte darstellen; vielmehr liefert die Methode Anhalt für die Anwesenheit von Antikörpern in Relation zur Nachweisgrenze.

Die Seren der Versuchstiere waren nach der Tötung bei -2o ^{o}C aufbewahrt worden und nach Abschluss der Versuche gesammelt ausgewertet worden.(Die Bestimmung der Ak-Titer übernahm für uns freundlicherweise Frau L.Heding vom Novo Forschungsinstitut, Kopenhagen,Dänemark)

2.6. Statistik

Die statistische Sicherung der Ergebnisse erfolgte mit dem t-Test nach Student. Als Grenzwert für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde 5% oder $2p < o,o5$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Morphometrische Ergebnisse

3.1.1. Normaltiere

An normalen, d.h. unbehandelten Kaninchenglomeruli wurden die folgenden Mittelwerte gefunden:

Bei einer mittleren glomerulären Anschnittsfläche von 8182,0 μ^2 und einer mittleren Gesamtzellzehl von 5o,18 Zellen konnten wir differenzieren: 12,48 (=24,79%) Deckzellen, 22,26 (=44,32%) Endothelzellen und 15,54 (=3o,89%) Mesangiumzellen. Die Mesangiumfläche betrug 343,o5 μ^2, der prozentuale Mesangiumanteil 4,25%. Die glomeruläre Zelldichte wurde mit 6,21 Zellen/1ooo μ^2 Glomerulusfläche, die mesangiale Zelldichte mit 4,52 Mesangiumzellen/1oo μ^2 Mesangiumfläche ermittelt.

3.1.2. MC-Rinderinsulin-Tiere

Im Vergleich zu den Normaltieren zeigten die mit MC-Insulin vom Rind immunisierten Versuchstiere nach 3o-tägiger Immunisierung keinerlei signifikante Veränderungen am Glomerulus. Nach 6o Tagen ist der prozentuale Mesangiumanteil an derGesamtfläche signifikant auf 5,46% angestiegen ($2p < o,o2$), die mesangiale Zelldichte fällt auf 3,53 Zellen ab ($2p < o,o5$). Nach 9o Tagen Versuchsdauer sind folgende Werte signifikant verändert:

- die Gesamtzellzahl ist auf 41,73 Zellen erniedrigt ($2p < o,o5$)
- der prozentuale Deckzellanteil ist auf 3o,36% gestiegen ($2p < o,oo5$)
- die mesangiale Zelldichte ist mit 3,28 Zellen weiterhin erniedrigt ($2p < o,o5$)

Zusammenfassend kann damit gesagt werden, dass in dieser Versuchsgruppe Veränderungen erst nach 6o Tagen auftreten, die insbesondere in einer anscheinend isolierten Verbreiterung des Mesangiums bestehen ohne gleichzeitige Vermehrung der Mesangiumzellen. Diese Veränderungen am Mesangium sind nach 9o Tagen nicht mehr feststellbar. (Tab. 1)

3.1.3. Proinsulin-Tiere

Beim Vergleich der hier ermittelten Werte mit den Normalwerten fällt auf, dass signifikante Veränderungen schon nach 3o-tägiger Immunisierung mit Proinsulin auftreten:

- die Gesamtzellzahl/looo μ^2 Glomerulusfläche ist auf 7,86 Zellen angestiegen ($2p < o,o2$)
- die Mesangiumfläche vergrössert sich auf einen Anteil von 5,45% ($2p < o,o2$)
- der Anteil der Mesangiumzellen ist auf 25,72% verringert ($2p < o,o5$)

Nach 6o Tagen weicht nur der Deckzellanteil signifikant von der Norm ab, der auf 29,89% ($2p < o,o5$) erhöht ist. Nach 9o Tagen ist nur die mesangiale Zelldichte mit 3,49 Zellen signifikant ($2p < o,o5$) erniedrigt. (Tab. 2)

In dieser Gruppe treten demnach die Veränderungen vorwiegend nach 3o Tagen auf, wobei auch hier eine Vergrösserung der Mesangiumfläche ohne eigentliche Mesangiumzellvermehrung festgestellt werden kann.

3.1.4. a/b-Komponenten-Tiere

Bei diesen Tieren ist nach 3o Tagen die Mesangiumfläche auf einen Anteil von 5,32% signifikant ($2p < o,o2$) angewachsen. Nach 6o und nach 9o Tagen liegt dieser Wert wieder im Normbereich.

Nach 6o-tägiger Versuchsdauer sind folgende Werte signifikant verändert:

- die Glomerulusfläche steigt auf 9993,6 μ^2 an ($2p < o,oo5$)
- die Mesangiumfläche ist auf 436,32 μ^2 angewachsen ($2p < o,o2$)
- die glomeruläre Zelldichte fällt auf 4,98 Zellen/looo μ^2 Glomerulusfläche ab ($2p < o,o5$)
- die mesangiale Zelldichte verringert sich auf 3,35 Zellen/loo μ^2 Mesangiumfläche ($2p < o,o25$)

Nach 9o Tagen Versuchsdauer bewegen sich alle ermittelten Werte im Normbereich. (Tab. 3)

Auch hier ist nach 3o Tagen eine Mesangiumverbreiterung der gleichen Grössenordnung wie bei den beiden vorgenannten Gruppen zu beobachten. Eine Mesangiumzellvermehrung wurde nicht festgestellt.

3.1.5. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich über die bei unseren Versuchen gefundenen morphometrischen Veränderungen am Glomerulus der Kaninchenniere sagen, dass die geringsten Veränderungen bei den MC-Rinderinsulin-Tieren gefunden wurden. Bei den Tieren, die mit a/b-Komponente behandelt wurden, konnten wir dagegen die deutlichsten morphometrischen Veränderungen beobachten. Für alle drei Versuchsgruppen gilt, dass diese Veränderungen fast ausnahmslos passager auftraten, d.h. am Versuchsende an den untersuchten Glomeruli keine oder nur unwesentliche morphometrische Veränderungen nachweisbar waren.

3.2. Immunologische Ergebnisse

3.2.1. Vorbemerkung

Neben den drei vorgenannten Ak-Titern wurde auch die Bestimmung der Antikörper gegen Proinsulin versucht, und zwar gegen Rinder- und gegen Schweine-Proinsulin. Dabei ergab sich jedoch in keinem Fall ein Wert, der die Nachweisgrenze erreicht oder überschritten hätte. Bei ca.95% der untersuchten Seren wurde kein Ak-Titer nachgewiesen, beim Rest lag der ermittelte Wert unter der Nachweisgrenze.

3.2.2. MC-Rinderinsulin-Tiere

In dieser Gruppe überschreitet kein Wert der drei bestimmten Ak-Titer die Nachweisgrenze. Gegen MC-Rinderinsulin sind nur nach 6o Tagen messbare Ak-Werte aufgetreten, die jedoch allesamt unter der spezifischen Nachweisgrenze lagen. (Tab. 1)

Das verwendete MC-Rinderinsulin scheint also im Tierversuch keine messbaren Antikörpertiter hervorzurufen.

3.2.3. Proinsulin-Tiere

Hier liegen die gewonnenen Daten teilweise deutlich über der Nachweisgrenze. Die Mittelwerte der Antikörper gegen MC-Rinderinsulin sind nach 3o Tagen auf o,o8 mU/ml angestiegen, liegen nach 6o Tagen beio,21 mU/ml und fallen nach 9o Tagen wieder auf o,o4 mU/ml ab.

Signifikant sind diese Veränderungen allerdings nicht.

Die Ak-Titer gegen Schweine-PP erreichen die Nachweisgrenze nicht.

Bei den Werten der Ak gegen die a-Komponente ist der ermittelte Wert nach 3o Tagen mit 34,o ng/ml etwas über die Nachweisgrenze angestiegen, die Werte nach 6o und 9o Tagen liegen allerdings wieder weit darunter. Auch diese Veränderungen sind nicht signifikant. (Tab. 2)

Im Tierversuch scheint also das uns zur Verfügung stehehnde Proinsulinpräparat nur geringe oder keine immunogene Wirkung zu besitzen.

3.2.4. a/b-Komponenten-Tiere

Die in dieser Versuchsgruppe ermittelten Ergebnisse liegen bei allen drei geprüften Ak-Titern deutlich über der Nachweisgrenze und sind durchweg höher als in den vorgenannten Gruppen.

- Die Ak gegen MC-Rinderinsulin liegen bei 3o-tägiger Versuchsdauer bei 3,33 mU/ml, nach 6o Tagen bei 1,27 mU/ml, und nach 9o Tagen bei 2,o5 mU/ml; signifikante Unterschiede im Versuchsablauf sind dies nicht, die Werte liegen allerdings deutlich über der Nachweisgrenze.
- Die Mittelwerte der Ak-Titer gegen Schweine-PP steigen von 2,96 ng/ml nach 3o Tagen auf 14,7 ng/ml nach 6o Tagen und auf 23,67 ng/ml nach 9o Tagen an. Signifikante Unterschiede im Versuchsablauf sind dies aufgrund der grossen Streuung der Ergebnisse nicht, immerhin liegen alle Werte teilweise deutlich über der Nachweisgrenze.
- Bei den Ergebnissen der Ak gegen die a-Komponente sind die deutlichsten Titeranstiege zu verzeichnen. Sie steigen von 87,2 ng/ml nach 3o Tagen auf 189,33 ng/ml nach 6o Tagen und auf 218,67 ng/ml nach 9o Tagen an. Diese Werte liegen deutlich über der Nachweisgrenze, die Unterschiede zwischen 3o- und 6o- und 3o- und 9o-tägiger Versuchsdauer sind signifikant.

Somit kann gesagt werden, dass die verwendete a/b-Komponente einen deutlichen und signifikanten Anstieg der Ak-Titer bewirkt und somit am stärksten immunogen wirksam ist.

4. Diskussion

Zusammenfassend lässt sich das Folgende sagen:

- in allen drei Versuchsgruppen (MC-Rinderinsulin, Proinsulin, a/b-Komponente) fanden sich nach 3o- bis 6o-tägiger Immunisierung Mesangiumverbreiterungen derselben Grössenordnung, die sich nach 9o Tagen sämtlich wieder normalisiert hatten.
- in keinem Fall wurde eine Mesangiumzellvermehrung festgestellt.
- die mesangiale Zelldichte ist in allen drei Versuchsgruppen gegenüber der Norm signifikant verringert.
- in den Versuchsgruppen MC-Rinderinsulin und Proinsulin wurde eine signifikante Deckzellvermehrung gefunden.
- die glomeruläre Zelldichte ist in der Proinsulingruppe nach 3o Tagen signifikant erhöht.
- bei Immunisierung mit MC-Rinderinsulin liegen die gewonnenen Werte für die Ak-Titer zu jeder Zeit unter der Nachweisgrenze.
- bei Immunisierung mit Proinsulin ist teilweise eine geringe Ak-Bildung zu verzeichnen, signifikante Unterschiede im Versuchsablauf ergeben sich jedoch nicht.
- bei Immunisierung mit a/b-Komponente liegen alle drei erhobenen Werte der Ak-Titer deutlich über der Nachweisgrenze, allerdings zeigen nur die Werte der Ak gegen die a-Komponente einen signifikanten Anstieg im Versuchsverlauf.

Das Mesangium erweist sich somit in unseren Untersuchungen als eine durch heterologe Proteine sehr leicht irritable Struktur, die auf kleinste immunogene Reize mit einer Verbreiterung reagiert, wobei in unseren Untersuchungen alle drei Substanzen in gleichem Maße als Reiz wirkten. Demgegenüber erfolgt eine signifikante Ak-Bildung nur bei Verabreichung von a/b-Komponente, während Proinsulin nur geringe und MC-Rinderinsulin keine Ak-Bildung induziert.

Zur Methodik der quantitativen Morphologie ist von vielen Autoren (IDIAKA et al. 68; KAWANO et al. 71; SØRENSEN 72) kritisch Stellung

genommen worden. Sie wurde jedoch von WEHNER (7o,74) durch Vereinfachung der Flächenbestimmung an nach Movat versilberten Semidünnschnitten und die dadurch mögliche hohe Anzahl der ausgewerteten Glomeruli entscheidend verbessert, so dass sie bei Beachtung einiger wichtiger Vorraussetzungen (z.B. Durchführung als Blindstudie, Auswahl von Glomeruli mit ausreichend grosser Anschnittsfläche) zuverlässige Ergebnisse liefert. Das Verfahren eignet sich insbesondere zur Darstellung geringgradiger quantitativer Veränderungen von Flächen bzw. Zellanteilen im Glomerulum, die eindrucksmässig nicht sicher erfasst werden können.

Mit dieser Methode untersuchte WEHNER in Zusammenarbeit mit Anderen (69,73,75,76,77) Veränderungen am Glomerulus der Niere bei diabetischer Stoffwechsellage bzw. bei Gabe von heterologem Insulin und dessen hochmolekularen Verunreinigungen:

WEHNER und ANDERS (69) fanden bei Untersuchungen an Nieren von Diabetikern eine kontinuierliche Zunahme des Mesangiumvolumens, eine Proliferation der Mesangium- und Endothelzellen und eine Abnahme der Deckzellen in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer und dem Ausprägungsgrad der Glomerulosklerose. Die ebenfalls bestimmten Ak-Titer gegen Insulin waren mit den mesangialen Veränderungen direkt korreliert.

WEHNER und MAJOREK (75) untersuchten Streptozotocin-diabetische Meerschweinchen auf frühe Veränderungen am Glomerulus; im Vordergrund der Veränderungen standen hier eine Mesangiumzellvermehrung und eine Vermehrung der Mesangiummatix.

WEHNER et al. (69) immunisierten Meerschweinchen mit Rinderinsulin 24 - 15o Tage lang. Sie fanden eine Mesangiumzellproliferation, eine Mesangiumverbreiterung (teilweise nodulär) und eine Abnahme der Deckzellen. Antikörper gegen Insulin konnten nachgewiesen werden, allerdings ergab sich keine Korrelation zwischen deren Höhe und der Dauer der Immunisierung.

WEHNER et al.(76) behandelten diabetische KK-Mäuse mit Depot-Insulin

vom Rind und MC-Schweine-Insulin. In der MC-Gruppe wurde weder eine Mesangiumzell- noch eine Mesangiumvermehrung gefunden; die mit Depot-Insulin behandelten Tiere wie die zur Kontrolle herangezogenen unbehandelten Tiere dagegen zeigten eine progrediente Mesangiumzellproliferation und Mesangiumverbreiterung, die in der Gruppe der mit Depotinsulin behandelten Tiere zunächst überschiessend war.

WEHNER, SCHOBER und DIETERICH (77) immunisierten gesunde Kaninchen über einen Zeitraum von drei Monaten mit MC-Insulin vom Schwein, a/b-Komponente aus Rinderinsulin und deren Lösungsmittel. In der MC-Insulin-Gruppe fand sich nur eine vorrübergehende Mesangiumzellproliferation, alle anderen morphologischen Parameter zeigten keine Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. Insulinantikörperbildung trat nicht auf. Durch Gabe des Lösungsmittels des MC-Insulins konnten ebenfalls keine morphologischen Veränderungen am Glomerulus hervorgerufen werden.
Die Gruppe der mit a/b-Komponente immunisierten Tiere dagegen wies eine deutliche Mesangiumzellproliferation und Mesangiumverbreiterung auf. Auch eine deutliche Bildung von Insulinantikörpern konnte in den Seren dieser Tiere nachgewiesen werden. Das Lösungsmittel der a/b-Komponente rief nur eine vorrübergehende mesangiale Reaktion hervor, während die Veränderungen bei der a/b-Komponente bei Versuchsende persistierten.

Die Verfasser schlossen aus diesen Ergebnissen, dass die primären Veränderungen am Glomerulus beim Diabetes in einer Mesangiumzellproliferation und Mesangiumverbreiterung bestehen. Da im Tierversuch die gleichen glomerulären Veränderungen durch Gabe von heterologem Insulin induziert werden konnten, wurden diese Veränderungen als immunologische Antwort des Mesangiums auf den Reiz eines als "fremd" erkannten hochmolekularen Proteins, hier des Insulins, interpretiert. In den zuletzt genannten Untersuchungen gelang eine eindeutige Differenzierung zwischen dem als "rein" angesehenen MC-Insulin, das im Tierversuch nur vorrübergehende oder keine Veränderungen am Mesangium hervorruft, und den in handelsüblichen Insulinpräparationen enthaltenen

hochmolekularen Verunreinigungen, der a/b-Komponente, bei der deutliche mesangiale Veränderungen im Sinne der diabetischen Glomerulosklerose und Insulinantikörper nachgewiesen werden konnten. Die hochmolekularen Kontaminanten in Insulinpräparationen wurden deshalb als wichtiger Faktor für die Entstehung der diabetischen Glomerulosklerose angesehen.

Diese morphometrischen Ergebnisse, vor allem die der zuletzt angeführten Arbeit von WEHNER, SCHOBER und DIETERICH (77), deren Ansatz und Vorgehen mit der unsrigen prinzipiell übereinstimmte, konnten wir nicht in allen Punkten bestätigen. Übereinstimmend mit den vorgenannten Untersuchungen fanden auch wir eine Mesangiumverbreiterung, die jedoch bei allen drei geprüften Substanzen in gleicher Weise auftrat und in allen Fällen passager war. Eine Mesangiumzellproliferation konnten wir nicht finden. Eine Deckzellverminderung wie oben beschrieben kam nicht zur Darstellung; wir fanden teilweise eine signifikante Deckzellproliferation.
In Übereinstimmung mit den vorgenannten Arbeiten finden wir unsere immunologischen Ergebnisse: Eine Antikörperbildung wurde nur bei Gabe von Proinsulin und a/b-Komponente festgestellt. Anhand der nachfolgenden kurzen Literaturübersicht soll eine Diskussion unserer Ergebnisse versucht werden.

Zur Frage der Auswirkungen der Insulinverunreinigungen finden sich Untersuchungen klinischer und experimenteller Art, die sich vor allem mit den immunologischen Aspekten beschäftigen:

FREYTAG et al.(73) und JANSEN und FREYTAG (73) beobachteten bei Versuchen an Mäusen, dass eine lymphocytäre Infiltration der Langerhans'schen Inseln schon nach geringen Dosen kristallinen Schweineinsulins auftrat, zur Erreichung desselben Effektes jedoch sehr hohe Dosen von Monokomponent-Insulin erforderlich waren. Desgleichen fanden sich bei Gabe von MC-Insulin nur geringe Insulinantikörper im Serum gegenüber hohen bei Gabe von wenig gereinigtem Insulin. Sie machten dafür ein als Antigen wirkendes hochmolekulares Protein ver-

antwortlich, das in kristallinem Schweineinsulin in hoher Konzentration vorlag, in der MC-Insulinpräparation dagegen nur in Spuren. Sie kamen zu dem Schluss, dass reines Insulin nach der Sanger'schen Formel nicht immunogen wirksam sein könne.

SCHLICHTKRULL (7o,72,78) führte Experimente an Kaninchen zur Immunogenität des Insulins bzw. seiner Verunreinigungen durch. Immunisierung mit MC-Insulinen liess Insulinantikörper garnicht oder nur vorrübergehend auftreten. Wurden diesen Tieren a- bzw. b-komponente verabreicht, traten deutliche Antikörper auf, wobei sich die a-Komponente als stärker immunogen wirksam erwies. Er folgerte daraus, dass nur die Verunreinigungen des Insulins mit den genannten hochmolekularen Proteinen eine Antikörperbildung induzieren, und er konnte diese Hypothese durch klinische Untersuchungen untermauern: MC-Insulin ruft bei noch nie mit Insulin behandelten Diabetikern keine oder nur eine geringfügige Antikörperbildung hervor, wobei Präparationen aus Schweinepankreas weniger immunogen wirksam sind als solche aus Rinderpankeas.

Diese klinischen Ergebnisse werden bestätigt durch die Untersuchungen von ANDREANI et al.(72), BRUNI et al.(73), CZYZYK (74), FRERICHS et al.(75), KORP und LEVETT (73), WEBER et al.(78) und WEGMÜLLER und FANKHAUSER (73). Alle Autoren fanden jedoch auch bei Gabe von MC-Insulinpräparaten eine Antikörperbildung, die aber in allen Fällen weit unter der der zum Vergleich herangezogenen handelsüblichen Insulinpräparate lag. Übereinstimmung lag darin vor, dass Komplikationen der Insulinbehandlung wie allergische Reaktionen der Haut,Lipoatrophie etc. bei Injektionen von MC-Insulin nicht auftreten und vorher hohe Antikörpertiter gegen Insulin allgemein eine rückläufige Tendenz aufwiesen. Auch der Insulinbedarf der Patienten verringerte sich nicht selten nach einigen Monaten.

DECKERT et al.(72) fanden bei Gabe von nichtchromatographiertem Humaninsulin zu psychiatischen Zwecken bei mehreren Patienten Insulinantikörper, die sie auf die in der Lösung enthaltene a-Komponente zurückführten. Nach Ansicht der Autoren könnte das Insulinmolekül als Hapten an die hochmolekulare a-Fraktion adsorbiert sein und dadurch

die Antikörperbildung auslösen. Neben den Verunreinigungen wird in dieser Arbeit die Bedeutung der verwendeten Lösung betont: danach ist die Form der Suspension oder der sauren Lösung stärker antigen wirksam als die der neutralen Lösung.

BRUNI et al.(78) bestimmten die Antikörper gegen Proinsulin und gegen die a-Komponente bei Diabetikern, die über lange Zeit mit MC-Insulin vom Schwein bzw. konvetionellem Insulin behandelt wurden. Bei den mit MC-Insulin behandelten Patienten konnten keine Antikörper gegen Proinsulin festgestellt werden, 2 von 13 Patienten entwickelten jedoch Antikörper gegen die a-Komponente. In der Versuchsgruppe, die konventionelles Insulin erhielt, waren sowohl gegen Proinsulin wie gegen die a-Komponente Antikörper nachweisbar. Die Antikörper von Patienten, die von konventionellem Insulin auf MC-Insulin umgestellt worden waren, wiesen signifikant niedrigere Werte auf als die der Patienten, die weiterhin konventionelles Insulin erhielten. Die ebenfalls bestimmten Insulinantikörper lagen bei der MC-Insulin-Gruppe signifikant unter den Werten, die bei Behandlung mit konventionellem Insulin gewonnen wurden.

Diese immunologischen Ergebnisse der bisher angeführten Arbeiten stimmen mit unseren Ergebnissen überein: auch wir konnten nach Immunisierung mit MC-Rinderinsulin keine Antikörper gegen Insulin bzw. gegen die a-Komponente in den Seren der Versuchstiere feststellen. Hohe Antikörpertiter sowohl gegen Insulin wie gegen die a-Komponente fanden wir dagegen in der Gruppe der mit a/b-Komponente immunisierten Tiere.

In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten von CHANCE und ELLIS (69) und MELANI et al.(7o) von Interesse, die sich mit der Frage der Antigenität des Proinsulins beschäftigen. Sie weisen auf die stark antigenen Eigenschaften des Polypeptids hin, das die A-Kette des Insulinmoleküls mit der B-Kette verbindet (wodurch Proinsulin entsteht). Dieses Polypeptid weist stärkere speziesspezifische Sequenzabweichungen der Aminosäuren auf als dies beim Insulinmolekül der Fall ist. CHANCE und Ellis konnten weiterhin hohe Proinsulinwerte in den Seren

von Diabetikern (beim jugendlichen Diabetes wie beim Erwachsenendiabetes) nachweisen, und sie schlossen daraus auf ein mit Proinsulin eng verwandtes, abnormes endogenes Insulin als Ursache für den Diabetes.

Diesen Untersuchungen widersprechen teilweise die Arbeiten von KERP et al.(7o) und HINKE et al.(7o). Sie fanden bei mit Insulin behandelten Diabetikern nur geringe spezifische Antikörper gegen Proinsulin und schlossen daraus, dass eine Insulinantikörperbildung nicht auf die Verunreinigungen konventioneller Insulinpräparationen mit Proinsulin zurückzuführen sei.

Auch unsere Ergebnisse sprechen für diese zuletzt genannte These: auf die Gabe von Proinsulin kam es nur zu einem vorrübergehenden Ansteigen der Antikörpertiter gegen Rinderinsulin und die a-Komponente, deren Werte weit unter denen lagen, die nach Immunisierung mit a-Komponente ermittelt wurden.

Über morphologische Veränderungen am Glomerulus der Niere beim Diabetes und nach experimenteller Gabe von heterologem Insulin beim Versuchstier berichten die folgenden Arbeiten:

GRIEBLE (6o) fand bei Kaninchen nach intravenöser Gabe von heterologem Insulin eine fokale und/oder diffuse Zellvermehrung im Glomerulus, wobei nach seinen Angaben diese Zellvermehrung aus einer Proliferation der Epithelzellen (=Deckzellen) bestand. In einem Fall fand er PAS-positive noduläre Veränderungen wie bei der beim Menschen beschriebenen Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson.

MOHOS et al.(63) erzeugten durch Immunisierung mit Insulin in komplettem Freund'schen Adjuvant an Kaninchen eine Glomerulosklerose zunehmenden Schweregrades. Die Veränderungen reichten von geringer lokalisierter oder diffuser Basalmembranverbreiterung bis hin zu schwersten PAS-positiven, unregelmässigen Schlingenverdichtungen mit gelegentlichen Nodulus-ähnlichen Veränderungen,wie sie beim Diabetes zu finden sind. Die glomeruläre Zellzahl zeigte zu Beginn des Versuches eine Zunahme, um mit zunehmender Obliteration der Glomeruli wieder

abzunehmen. Der im Versuchsverlauf beobachtete Antikörpertiter gegen Insulin ergab keine Korrelation zwischen dessen Höhe und der Schwere der glomerulären Veränderungen.

DITSCHERLEIN et al.(67) immunisierten gesunde Kaninchen mit Altinsulin intramuskulär bis zu 24 Monate lang. Lichtmikroskopisch fanden sie eine geringe Mesangiumverbteiterung, die nicht selten herdförmig war; die für die Glomerulosklerose typischen Noduli wurden nicht beobachtet. Elektronenmikroskopisch bestätigte sich die Mesangiumverbreiterung, die nach diesen Angaben aus einer erheblichen Vermehrung der Matrixmassen besteht. Die anderen glomerulären Zellen veränderten sich nicht. Die Autoren ordneten diese Befunde den Anfangsstadien der diabetischen Glomerulosklerose zu.

FUCHS et al.(73) berichten über die glomerulären Reaktionen bei Meerschweinchen und Hunden, denen heterologes Insulin verabreicht wurde. Sie fanden eine statistisch gesicherte Gesamtzellvermehrung, die vorwiegend aus einer Mesangiumzellvermehrung bestand. Elektronenoptisch wurde eine herdförmige Vermehrung der Mesangiumsubstanz und eine Aktivierung der Deckzellen beobachtet.

BLOODWORTH et al.(73) beschrieben an den Nieren Alloxan-diabetischer Rhesusaffen mit länger als 7 Jahren Erkrankungsdauer in allen Fällen eine diffuse Glomerulosklerose, in 10-15% auch mit nodulären Läsionen, der eine Proliferation der Mesangiumzellen und eine Einlagerung basalmembranartigen "hyalinoiden" Materials ins Mesangium zugrunde lag.

ANJO et al.(73) untersuchten die mesangialen Veränderungen an Alloxan-diabetischen Ratten (Diabetesdauer 12 Monate). Sie fanden granuläre und fibrilläre Cytoplasmaeinschlüsse in den Mesangiumzellen und eine Verdickung der Mesangiummatrix aufgrund von basalmembranartigen Einlagerungen; diese Veränderungen entsprächen denen des Frühstadiums der Glomerulosklerose beim Menschen. Zusätzlich fanden sie eine Aktivierung der Deckzellen. Die Autoren folgerten hypothetisch daraus, dass durch den Diabetes die Funktion der Mesangiumzellen eingeschränkt ist, die von den Epithelzellen gebildete Basalmembran zu katabolisieren, die deswegen aufgrund ihrer Ablagerung im Mesangium

zu dessen Grössenzunahme führt.

SORGER et al.(77) fanden bei licht- und elektronenoptischer Auswertung von Nierenbiopsien von 22 Diabetikern mit unterschiedlicher Erkrankungsdauer eine Mesangiumzell- und Mesangiummatrixvermehrung, und zwar in allen untersuchten Fällen und in unterschiedlicher Ausprägung. Durch Immunofluorescenzmikroskopie konnten im Mesangium IgA und IgG nachgewiesen werden, ebenso markiertes Insulin. Die Autoren erklären diese Mesangiumveränderungen als Überfunktion und Proliferation der Mesangiumzelle auf den Reiz eindringender Immunglobuline und Serumproteine durch ein verändertes kapilläres Endothel.

Dass das Mesangium im Rahmen immunologischer Vorgänge wie das RES reagiert, bestätigen auch die Untersuchungen von MAUER et al.(73,75, 76) und SEELIG et al.(74).
Das Mesangium von Kaninchen (MAUER et al.73) zeigte auf Antigenreiz eine deutliche Zellproliferation und Matrixvermehrung, deren Mechanismus in dieser Arbeit ungeklärt blieb.
Bei diabetischen Ratten, die mit einer Inselzelltransplantation behandelt wurden und danach wieder normalisierte Insulinspiegel aufwiesen, zeigte sich ein deulicher Rückgang der vorher nachweisbaren Mesangiumverbreiterung und eine Abnahme von IgG und IgM im Mesangium. Sie schlossen daraus, dass die diabetische Glomerulopathie auf die diabetische Stoffwechsellage zurückgeführt werden muss, wobei der Insulinmangel für die Pathogenese von grösserer Bedeutung ist als die Hyperglykämie. Die Mesangiumverbreiterung resultiert demnach aus der durch den Insulinmangel eingeschränkten Fähigkeit des Mesangiums, dort abgelagerte Makromoleküle zu verstoffwechseln.

Zusammenfassend lässt sich über das oben Angeführte folgendes feststellen:
Das Mesangium steht bei der diabetischen Nephropathie beim Versuchstier wie beim Menschen im Vordergrund der morphologischen Veränderungen. Von allen Autoren werden Mesangiumverbreiterungen aufgrund einer Matrixvermehrung beschrieben; viele Autoren berichten über eine echte

Mesangiumzellvermehrung. Weiterhin konnten Immunglobuline im Mesangium gefunden werden, daneben auch Insulin. Ähnliche Veränderungen konnten durch Immunisierung gesunder Versuchstiere mit Insulinpräparationen ausgelöst werden, wobei der Schweregrad der Veränderungen von den in den Insulinpräparationen enthaltenen Verunreinigungen und deren Menge abzuhängen scheint. Die Mesangiumverbreiterung war im Tierversuch besserungsfähig bei durch Inselzelltransplantation normalisierter Stoffwechsellage, bzw. war nicht progredient bei Gabe von MC-Insulin. Bezüglich des Verhaltens der Deckzellen bei diabetischer Stoffwechsellage bzw. bei Immunisierung mit Insulin sind die Angaben der genannten Autoren nicht einheitlich: eine Deckzellvermehrung fand nur GRIEBLE (60), andere berichten über eine Deckzellaktivierung, wieder andere stellten eine Verminderung des Deckzellanteils fest. Zur Pathogenese der Mesangiumverbreiterung werden einige interessante Theorien angeführt, Einigkeit besteht jedoch darin, dass die genannten Veränderungen am Glomerulus durch immunogen wirksame hochmolekulare Proteine (wie Insulin) hervorgerufen werden können, und dass sie zumindest den Frühstadien einer diabetischen Glomerulosklerose entsprechen.

Bei der klinischen und experimentellen Untersuchung von Antikörpertitern unter Insulintherapie lässt sich sehr gut nachweisen, dass hochgereinigte Insuline mit zunehmendem Reinheitsgrad an Immunogenität abnehmen: wo noch Verunreinigungen vorhanden waren, führten sie zu einem deutlichen und anhaltenden Ansteigen der Antikörpertiter. Bei Wegfall der Verunreinigungen kam es zum Abfallen vorher bestehender Antikörpertiter.

Diese Aussagen werden durch unsere Untersuchungen bestätigt: Die von uns verabreichten Verunreinigungen des Insulins, eine Präparation, die die a- und die b-Komponente enthielt, riefen einen signifikanten und anhaltenden Anstieg der Antikörpertiter hervor. Proinsulin hatte eine weit geringere immunologische Wirkung, MC-Rinderinsulin gar keine. Dass aber Insulin selbst in hochgereinigtem Zustand zumindest passagere Veränderungen im Sinne einer Mesangiumver-

breiterung hervorruft, haben unsere Versuche ebenfalls gezeigt. Gleichartige passagere Verbreiterungen des Mesangiums wurden auch bei den Tieren gefunden, die Proinsulin bzw. die a/b-Komponente erhalten hatten. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch F.EICHE (Med.Diss.Tübingen, in Vorbereitung), der die Auswirkungen der a-Komponente und die der b-Komponente getrennt in der gleichen Versuchsanordnung untersuchte. Danach führte die a-Komponente zu einem deutlichen Antikörpertiteranstieg, wohingegen die b-Komponente, in der das von uns untersuchte Proinsulin einen Anteil von ca.5o% ausmacht, weit weniger zu einem Ak-Titeranstieg führte. In seinen morphometrischen Untersuchungen konnte auch er nur eine passagere Reaktion des Mesangiums im Sinne einer Verbreiterung feststellen. Das Mesangium ist offensichtlich in der Lage, nach anfänglicher Proliferation auf den Reiz durch "fremde" Proteine diese zu metabolisieren und damit in seinen Ausgangszustand zurückzukehren.

Schwierig einzuordnen ist die von uns gefundene teilweise signifikante Vermehrung des Deckzellanteils, die nicht in allen Gruppen auftrat, zumal auch die Angaben in der Literatur nicht einheitlich sind. Ein Zusammenhang mit der Verbreiterung des Mesangiums, z.B. im Sinne der von ANJO et al.(73) geäusserten Theorie liegt jedoch nahe, bedarf aber der weiteren Klärung.

Die von uns und anderen Autoren gefundenen Veränderungen am Glomerulus sind jedoch nicht spezifisch für die in Insulinpräparationen enthaltenen Verunreinigungen. Sie werden auch von anderen hochmolekularen Proteinen (MAUER et al.73; SEELIG et al.74) ausgelöst, und können auch ohne Einwirkung von Insulin bei Diabetikern und im diabetischen Versuchstier beobachtet werden. Dass aber die diabetische Nephropathie bzw. die diabetische Mikroangiopathie möglicherweise eine immunologische Erkrankung darstellt, dafür sprechen die Untersuchungen von ROY et al.(68,71), PENCHEV et al.(68), OHNEDA et al. (74) und in jüngster Zeit IRVINE et al.(78,78).

ROY et al.(68,71) fanden bei in vitro-Versuchen, dass das im Serum von Diabetikern enthaltene Insulin deutlich weniger biologische Ak-

tivität zeigte als das gesunder Probanden. Da sie keine Unterschiede in der Aminosäurensequenz feststellen konnten, führten sie dies auf eine abweichende stereologische Anordnung des Insulinmoleküls beim Diabetiker zurück.

PENCHEV et al.(68) untersuchten das Vorkommen von insulinpräzipitierenden Antikörpern im Serum von insulinbehandelten und unbehandelten Diabetikern bzw. Patienten mit Prädiabetes. Es stellte sich heraus, dass diese Antikörper bei den unbehandelten Diabetikern signifikant häufiger auftraten. Die Pathogenese des Diabetes wurde aufgrund dieser Befunde als Autoimmunerkrankung gegen körpereigenes Insulin diskutiert.

OHNEDA et al.(74)schliesslich konnten im Serum einer spontan hypoglykämischen Patientin ohne chirurgisch nachweisbarem Insulinom, die niemals vorher Insulin zu therapeutischen Zwecken erhalten hatte, Autoantikörper gegen endogenes Insulin nachweisen.

IRVINE et al.(78,78) haben in neueren Untersuchungen das Vorhandensein von AgAk-Komplexen und Inselzellantikörpern im Serum neudiagnostizierter insulinabhängiger Diabetiker sofort nach Diagnosestellung und nach 3 - 12 Monatiger Behandlung beschrieben. Sofort nach Diagnosestellung fanden sich gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höhere AgAk-Komplexe, die nach 3-monatiger Behandlung wieder im Normbereich waren. Desweiteren fand sich eine positive Korrelation zwischen Vorhandensein von Inselzellantikörpern und AgAk-Komplexen. Es wird die Möglichkeit diskutiert, dass diese AgAk-Komplexe, möglicherweise zusammengesetzt aus Pankreasantigen und Inselzellantikörpern, eine Rolle bei der Pathogenese des Diabetes spielen. Für Auftreten und Menge dieser AgAk-Komplexe wird die verschlechterte Funktion des RES bei diabetischer Stoffwechsellage angeführt.

In einer zweiten Untersuchung wurden die Höhe der AgAk-Komplexe mit der Schwere der diabetischen Mikroangiopathie (am Beispiel der Retinopathie) direkt korreliert gefunden, sowohl bei langdauerndem Diabetes mit proliferativer Retinopathie wie bei kurzdauerndem Diabetes mit früher Retinopathie. Die Behandlungsart des Diabetes (Insulin

oder orale Antidiabetika) war dabei ohne Einfluss. Eine Korrelation zu Insulinantikörpern trat nicht auf. Daraus schlossen die Autoren, dass AgAk-Komplexe, die nicht notwendigerweise aus Insulin- und Anti-insulin-Antikörpern bestehen, zur Entstehung der diabetischen Mikro-angiopathie beitragen.

Angesichts des zuletzt Gesagten ist es sicherlich berechtigt, Diabetikern ein möglichst wenig immunogen wirksames Insulinpräparat zu geben, wie dies in den Monokomponent-Insulinen heute zur Verfügung steht. Dies gilt insbesondere für den jugendlichen Diabetiker. Ob allerdings damit die diabetische Mikroangiopathie auf Dauer zu verhindern ist, wie dies die Tierversuche zeigen, lässt sich nur mit weiteren, vor allem klinischen Studien klären.

5. LITERATUR

Andreani,D., Javicoli,M., Coletti,A., Menzinger,G.
Esperienze nel trattamento del diabete con le insuline di tipo monocomponente (MC) e monospezie (MS)
Folia Endocr. (Roma) 25, 516 - 539 (1972)

Anjo,A., Couturier,E.
Mesangial changes of the renal glomerulus in long-term diabetic rats
Path. Europ. 1o, 21 - 27 (1975)

Bloodworth,J.M.B. jr., Engermann,R.L., Anderson,P.J.
Microangiopathy in the experimentally diabetic animal
in: Advances in metabolic disorders, Suppl.2: Vascular and neurological changes in early diabetes
(ed.: R.A.Camerini-Davalos and H.S.Cole)
pp 245 - 25o New-York - London : Academic Press 1973

Bruni,B., D'Alberto,M., Osenda,M., Ricci,C., Turco,G.L.
Clinical trial with monocomponent-lente-insulins
Diabetologia 9, 492 - 498 (1973)

Bruni,B., Gamba,S., Regis,G., Turco,G.L.
Proinsulin and a-component antibodies in diabetics after long-term monocomponent insulin treatment
Diabetologia 14 165 - 169 (1978)

Burckholder,P.M.
Immunology and immunohistopathology of renal diseases
in: Structural basis of renal disease (ed.: E.L.Becker)
pp197 - 218 New-York - Evanston - London, Hoeber Medical Division, Harper and Row 1968

Chance,R.E., Ellis,R.M.
Proinsulin, single-chain precursor of insulin
Arch.intern.Med. 123 229 - 236 (1969)

Christiansen,Aa.H.
Radioimmunoelektrophoresis in the determination of insulin binding to IgG. Methodological studies.
Horm.Metab.Res. 5 147 - 154 (1973)

Czyzyk,A.
Serum-Spiegel insulinbindender Antikörper bei mit Monokomponent-Insulin behandelten diabetischen Patienten.
Diabetologia 1o 1 - 4 (1974)

Deckert,T., Andersen,O.O., Grundahl,E., Kerp,L.
Isoimmunisation of man by recrystallzed human insulin
Diabetologia 8 358 - 361 (1972)

Ditscherlein,G., Marx,J., Dena,R.
Elektronenmikroskopische Beunde am Kaninchenglomerulum nach 1½ - 2-jähriger Insulinmedikation.
Exp.Path. 1 165 - 176 (1967)

Frerichs,H., Deuticke,U., Kremer,G.J., Jacobi,O.,Drost,H., Schmidt,P., Vølund,Aa.
Purified Insulins. A clinical study on the occurrence of insulin-binding antibodies.
Diabetologia 11 343 (1975)

Freytag,G., Jansen,F.K., Klöppel,G.
Immune reactions to fractions of crystalline insulin. I.: Significance of lymphocytic infiltrates in the endocrine and exocrine pancreas of mice.
Diabetologia 9 185 -19o (1973)

Fuchs,U., Lohmann,D., Menzel,R., Ambrosius,H., Pohl,A., Schade,J., Sorger,K., Timm,G.
Experimentelle Insulinallergie und diabetische Glomerulosklerose
Exp.Path. 8 241 - 265 (1973)

Grieble,H.G.
Renal lesions induced by heterologous insulin: An example of foreign protein nephritis.
J.Lab.clin.Med. 56 19 - 2o (196o)

Gundersen,H.J.G., Østerby,R.
Glomerular size and structure in diabetes mellitus. II.: Late abnormalities.
Diabetologia 13 43 - 48 (1977)

Hinke,H., Steinhilber,S., Kasemir,H., Kerp,L.
Quantitative Untersuchungen zur Antikörperbildung von Rinderinsulin und Rinderproinsulin im Serum insulinbehandelter Diabetiker.
Verh.dtsch.Ges.inn.Med. 76 375 - 378 (197o)

Idiaka,K., McCoy,J., Kimmelstiel,P.
The glomerular mesangium. A quantitative analysis.
Lab.Invest. 19 636 - 643 (1968)

Irvine,W,J., Di Mario,U., Guy,K., Feek,C.M., Gray,R.S., Duncan,C.J.P.
Immune complexes in newly diagnosed insulin-dependent (Type I) diabetics.
J.Clin.Lab.Immunol. 1 183 - 186 (1978)

Irvine,W.J., Di Mario,U., Guy,K., Javicoli,M., Pozzilli,P., Lumbroso,B., Andreani,D.
Immune complexes and diabetic microangiopathy
J.Clin.Lab.Immunol. 1 187 - 191 (1978)

Jansen,F.K., Freytag,G.
Immune reactions to fractions of crystalline insulin. II.: May peri-insulitis be produced by an antigen different from the true Sanger-insulin?
Diabetologia 9 191 - 196 (1973)

Kawano,K., McCoy,J., Wenzel,J., Porch,J., Howard,C., Goddard,M., Kimmelstiel,P.
Quantitation of glomerular structure. A study of methodology.
Lab.Invest. 21 343 - 348 (1971)

Kerp,L., Steihilber,S., Kasemir,H.
Besitzt die Proinsulinverunreinigung kommerzieller Insulinpräparate Bedeutung für die Stimulierung von Insulinantikörpern?
Klin.Wschr. 48 884 - 885 (197o)

Korp,W., Levett,R.E.
Erfahrungen mit Monokomponent-Insulinen.
Wien.klin.Wschr. 85 326 - 33o (1973)

Mauer,S.M., Sutherland,D.E.R., Howard,R.J., Fish,A.J., Najarjan,J.S., Michael,A.F.
The glumerular mesangium. III.: Acute immune mesangial injury : a new model of glomerulonephritis.
J.exp.Med. 173 553 - 57o (1973)

Mauer,S.M., Steffes,M.W., Sutherland,D.E.R., Najarjan,J.S., Michael,A.F., Brown,D.M.
Studies on the rate of regression of the glomerular lesions in diabetic rats treated with pancreatic islet transplantation.
Diabetes 24 28o -285 (1975)

Mauer,S.M., Steffes,M.W., Michael,A.F., Brown,D.M.
Studies of diabetic nephropathy in animals and man.
Diabetes 25 (Suppl.2) 85o - 857 (1976)

Melani,F., Rubinstein,A.H., Steiner,D.F.
Human serum proinsulin
J.clin.Invest. 49 497 - 5o7 (197o)

Mohos,S.C., Hennigar,G.R., Fogelmann,J.A.
Insulin-induced glomerulosclerosis in the rabbit
J.exp.Med. 118 667 - 68o (1963)

Ohneda,A., Matsuda,K., Sato,M., Yamagata,S., Sato,T.
Hypoglycaemia due to apparent autoantibodies to insulin. Characterization of insulin-binding protein.
Diabetes 23 41 - 5o (1974)

Østerby,R.
Morphometric studies of the peripheral glomerular basement membrane in early juvenile diabetes. I.: Development of the initial basement membrane thickening.
Diabetologia 8 84 - 92 (1972)

Østerby,R.
Morphometric studies of the peripheral glomerular basement membrane. II.: Topography of the initial lesions.
Diabetologia 9 1o8 - 114 (1973)

Østerby,R., Gundersen,H.J.G.
Glomerular size and structure in diabetes mellitus. II.: Early abnormalities
Diabetologia 11 225 - 229 (1975)

Penchev,J., Andreev,D., Ditzov,S.
Insulin-precipitating antibodies in insulin-treated and untreated diabetic patients.
Diabetologia 4 164 - 166 (1968)

Roy,C.C., Shapcott,P.J., O'Brien,P.
The case for an 'abnormal' insulin in diabetes mellitus.
Diabetologia 4 111 - 117 (1968)

Roy,C.C., Gotlin,R., Shapcott,D., Montgomery,A., O'Brien,P.
Effects of insulin from normal and diabetic human pancreas on RNA-labeling in fibroblast-cultures.
Diabetes 2o 1o - 14 (1971)

Salazar,H., Chez,R.A., Pardo,M.
Absence of ultrastructural changes in the basement membrane of muscle capillaries in streptozotocin-induced carbohydrate intolerance in rhesus-monkeys.
Amer.J.Path. 71 437 - 443 (1973)

Seelig,H.P., Seelig,R., Roth,E., Roth,E.
Antibodies reacting with glomerular mesangium. Isolation and immunopathology.
Virchows Arch.Abt.A Path.Anat.Histol.
366 313 - 33o (1975)

Siperstein,M.D., Unger,R.H., Madison,L.L.
Studies of muscle capillary basement membrane in normal subjects, diabetic and prediabetic patients.
J.clin.Invest. 47 1973 - 1999 (1968)

Sørensen,F.H.
Quantitative studies of the renal corpuscles. I.: Intraglomerular, interglomerular and interfocal variation in the normal kidney.
Act.Path.Microbiol.Scand.Section A
8o 115 - 124 (1972)

Sorger,K., Schade,J., Caffier,P., Fuchs,U., Taubert,G., Wilmbusse,R., Osten,B., Wüstenberg,P.W.
Renal biopsies performed on diabetics.
Exp.Path. 15 1o6 - 117 (1977)

Sundler,F., Hakanson,R., Larsson,L.-I.
Ontogeny of rat pancreatic polypeptide (PP) cells.
Cell.Tiss.Res. 178 3o3 - 3o6 (1977)

Sundler,F., Hakanson,R., Lundquist,I., Larsson,L.-I.
Effect of alloxan on rat pancreatic polypeptide (PP) cells
Cell.Tiss.Res. 178 3o7 - 312 (1977)

Schlichtkrull,J.
Proinsulin und verwandte Proteine - Chemische und biologische Untersuchungen.
Verh.dtsch.Ges.inn.Med. 76 14 - 21 (197o)

Schlichtkrull,J., Brange,J., Hallund,O., Christiansen,Aa.H., Heding,L.G., Jørgensen,K.H.
Hochgereinigtes Insulin zu therapeutischen Zwecken.
Vortrag, gehalten auf der 8.Jahresversammlung der Schweizerichen Diabetes-Gesellschaft in lausanne am 29.Jan.1972

Schlichtkrull,J.
Purity and antigenicity of insulin preparations.
Nach einem Vortrag während des Insulin Workshop, Juvenile Diabetes Foundation New-York Mai 1978
Abstracta Diabetologia XIV 2o9 - 216 (1978)

Waldhäusl,W.K., Frisch,H., Haydl,H.
Vorkommen und Bedeutung von Insulinantikörpern bei Diabetikern und ihre Beeinflussung durch Monokomponent-Insulin.
Vortrag, gehalten auf der 8.Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes Madrid/Spanien 6. - 8.September 1972

Wegmüller,E., Fankhauser,S.
Die Antigenität verschiedener Depotinsulinpräparationen bei Diabetikern
Helv.Med.Acta Suppl.5o 13o (197o)

Weber,B., Tech,J., Schmidt,H., Oberdisse,U.
Antikörperbildung und Insulinbedarf von diabetischen Kindern während der Behandlung mit gereinigten Schweineinsulinpräparaten.
Europ.J.Ped. 128 89 - 1o2 (1978)

Wehner,H.
Morphologische Methoden in der Routinediagnostik der Nierenpathologie (Glomerulonephritis).
Beitr.Path. 141 4o2 - 4o3 (197o)

Wehner,H.
Quantitative Pathomorphologie des Glomerulum der menschlichen Niere.
Veröffentlichungen aus der Pathologie Heft 95
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1974

Wehner,H.
Zur Aetiologie der diabetischen Mikroangiopathie
Hippokrates 47 5o8 - 51o (1974)

Wehner,H.
Diabetische Glomerulosklerose
Hippokrates 47 172 - 174 (1976)

Wehner,H., Anders,E.
Quantitativ morphologische Befunde an den Glomerula in Nieren von Diabetikern.
Verh.dtsch.Ges.Path. 53 38o - 383 (1969)

Wehner,H., Schade,U., Liebermeister,E., Veigel,J.
Glomeruläre Veränderungen nach Immunisierung mit heterologem Insulin.
Virchows Arch.Abt.A Path.Anat.Histol.
349 345 - 356 (197o)

Wehner,H., Majorek,B.
Early glomerular changes in streptozotocin diabetes of the guinea pig.
Virchows Arch.Abt.A Path.Anat.Histol.
368 179 - 189 (1975)

Wehner,H., Wagner,H., Podmaniczky,A.
Die Beeinflussbarkeit der Glomerulosklerose bei diabetischen KK-Mäusen durch Insulin.
Verh.dtsch.Ges.Path. 6o 315 (1976)

Wehner,H., Schober,B., Dieterich,R.
Quantitative morphological analysis of glomerular changes of the rabbit kidney on treatment with insulin preparations of different purity.
Virchows Arch.Abt.A Path.Anat.Histol.
374 229 - 238 (1977)

6. Anhang

6.1. Tabellen

Tab. 1 : Zusammenstellung der Werte, die in der Gruppe der mit MC-Rinderinsulin immunisierten Tiere gefunden wurden

Tab. 2 : Zusammenstellung der Werte, die in der Gruppe der mit Proinsulin immunisierten Tiere gefunden wurden.

Tab. 3 : Zusammenstellung der Werte, die in der Gruppe der mit a/b-Komponente immunisierten Tiere gefunden wurden

Legende: groß geschriebene Zahlen (z.B. 26,78) bezeichnen signifikant von der Kontrollgruppe abweichende Werte

Pfeile bezeichnen die signifikanten Abweichungen innerhalb der Versuchsgruppe

6.2. Diagramme

MC-Rinderinsulin

Proinsulin

a/b-Komponente

Kontrollgruppe

Markiert wird zusätzlich die Standardabweichung (senkrechter Strich). Bei der Kontrollgruppe ist der Mittelwert $\pm$ der SD als Fläche markiert.

TAB.1 MC-RINDERINSULIN	KONTROLLGRUPPE	30 TAGE	60 TAGE	90 TAGE	
GESAMTZELLZAHL	50,28 ± 2,61	47,88 ± 2,76	48,21 ± 1,80	41,73 ± 1,47	= n
DECKZELLEN	12,48 ± 0,82 (24,79 ± 0,91)	13,99 ± 1,00 (29,38 ± 2,02)	13,39 ± 0,52 (27,83 ± 0,94)	12,64 ± 0,32 (30,36 ± 0,89)	= n = %
ENDOTHELZELLEN	22,26 ± 1,11 (44,32 ± 1,05)	20,48 ± 1,08 (42,83 ± 0,55)	20,52 ± 0,86 (42,56 ± 0,63)	17,85 ± 0,64 (42,79 ± 0,53)	= n = %
MESANGIUMZELLEN	15,54 ± 1,30 (30,89 ± 1,91)	13,41 ± 1,55 (27,80 ± 2,04)	14,30 ± 0,72 (29,61 ± 0,50)	11,24 ± 0,71 (26,35 ± 0,75)	= n = %
GLOMERULUSFLÄCHE	8182,0 ± 479,53	7398,0 ± 363,77	7445,52 ± 353,15	7388,0 ± 482,33	= u^2
GESAMTZELLZAHL/ 1000 u^2 GLOM.-FL.	6,21 ± 0,44	6,48 ± 0,31	6,50 ± 0,17	5,70 ± 0,29	= n
MESANGIUMFLÄCHE u^2	346,05 ± 21,05	381,15 ± 31,09	407,52 ± 29,59	343,80 ± 23,62	= u^2
MESANGIUMFLÄCHE %	4,25 ± 0,23	5,16 ± 0,39	5,46 ± 0,26	4,65 ± 0,12	= %
MESANGIUMZELLEN/ 100 u^2 MES.-FL.	4,52 ± 0,41	3,49 ± 0,15	3,54 ± 0,15	3,28 ± 0,15	= n
AK GEGEN RINDER-INSULIN (MU/ML)	—	0,00	0,01 ± 0,00	0,00	Det.-Limit 0,05 mU/ml
AK GEGEN SCHWEINE-PP (NG/ML)	—	0,08 ± 0,05	0,52 ± 0,13	0,18 ± 0,14	Det.-Limit 1,00 ng/ml
AK GEGEN A-KOMPONENTE (NG/ML)	—	6,00 ± 3,56	4,40 ± 2,23	0,00 ± 0,00	Det.-Limit 25,00 ng/ml

Tab. 2 Proinsulin

	Kontrollgruppe	30 Tage	60 Tage	90 Tage	
Gesamtzellzahl	50,28 ± 2,61	56,46 ± 4,26	45,76 ± 1.19	48,42 ± 2,90	= n
Deckzellen	12,48 ± 0,82 (24,79 ± 0,91)	15,30 ± 0,65 (27,62 ± 2,22)	13,62 ± 0,55 (29,89 ± 1,57)	12,56 ± 0,41 (26,14 ± 1.01)	= n = %
Endothelzellen	22,26 ± 1,11 (44,32 ± 1,05)	26,43 ± 2,35 (46,66 ± 1,44)	19,53 ± 1,16 (42,54 ± 1,48)	22,08 ± 1,63 (45,49 ± 0,93)	= n = %
Mesangiumzellen	15,54 ± 1,30 (30,89 ± 1,91)	14,73 ± 1,89 (25,72 ± 1,23)	12,61 ± 0,66 (27,56 ± 1,28)	13,78 ± 1,01 (28,38 ± 0,62)	= n = %
Glomerulusfläche	8182,0 ± 479,53	7189,0 ± 435,77	7371,0 ± 442,75	7935,0 ± 649,95	= u^2
Gesamtzellzahl/ 1000 u^2 Glom.-Fl.	6,21 ± 0,44	7,86 ± 0.31	6,27 ± 0,30	6,16 ± 0,24	= n
Mesangiumfläche u^2	346,05 ± 21,05	393,84 ± 39,14	348,48 ± 24,89	394,56 ± 25,71	= u^2
Mesangiumfläche %	4,25 ± 0,23	5,45 ± 0,28	4,74 ± 0,21	5.01 ± 0,24	= %
Mesangiumzellen/ 100 u^2 Mes.-Fl.	4,52 ± 0,41	3,74 ± 0,27	3,64 ± 0,10	3,49 ± 0.16	= n
AK gegen Rinder-Insulin (mU/ml)	—	0,08 ± 0,04	0,21 ± 0,12	0,04 ± 0,02	Det.-Limit 0,05 mU/ml
AK gegen Schweine-PP (ng/ml)	—	0,56 ± 0,07	0,70 ± 0,14	0,68 ± 0,14	Det.-Limit 1,00 ng/ml
AK gegen A-Komponente (ng/ml)	—	34,00 ± 19,43	4,80 ± 1,77	9,20 ± 4,14	Det.-Limit 25,00 ng/ml

Tab. 3 a/b-Komponente	Kontrollgruppe	3o Tage	6o Tage	9o Tage	
Gesamtzellzahl	5o,28 ± 2,61	52,73 ± 3,32	47,67 ± 2,61	47,57 ± 3,54	= n
Deckzellen	12,48 ± o,82 (24,79 ± o,91)	13,1o ± o,51 (25,31 ± 2,15)	12,11 ± o,95 (25,33 ± 1.21)	1o,93 ± o,63 (23,25 ± 2,27)	= n = %
Endothelzellen	22,26 ± 1,11 (44,32 ± 1,o5)	23,6o ± 2,51 (44,26 ± 2,23)	21,o3 ± 1,56 (43,98 ± 1,14)	22,35 ± 2,56 (46,79 ± 2,42)	= n = %
Mesangiumzellen	15,54 ± 1,3o (3o,89 ± 1,91)	16,o3 ± 1,oo (3o,43 ± o,71)	14,53 ± o,45 (3o,68 ± 1,o7)	14,28 ± 1,39 (29,93 ± 1,1o)	= n = %
Glomerulusfläche	8182,o ± 479,53	7873,2 ± 189,69	9993,6 ± 1o3,37	8946,6 ± 623,32	= u^2
Gesamtzellzahl/ 1ooo u^2 Glom.-Fl.	6,21 ± o,44	6,68 ± o,32	4,98 ± o,3o	5,39 ± o,62	= n
Mesangiumfläche u^2	346,o5 ± 21,o5	419,76 ± 23,7o	436,32 ± 18,85	354,oo ± 25,4o	= u^2
Mesangiumfläche %	4,25 ± o,23	5,32 ± o,24	4,36 ± o,18	3,96 ± o,17	= %
Mesangiumzellen/ 1oo u^2 Mes.-Fl.	4,52 ± o,41	3,85 ± o,19	3,35 ± o,16	4,o8 ± o,53	= n
AK gegen Rinder-Insulin (mU/ml)	—	3,33 ± 1,oo	1,27 ± o,4o	2,o5 ± 1,7o	Det.-Limit o,o5 mU/ml
AK gegen Schweine-PP (ng/ml)	—	2,96 ± 2,23	14,7o ± 7,62	23,67 ± 22,27	Det.-Limit 1,oo ng/ml
AK gegen A-Komponente (ng/ml)	—	87,2o ± 22,79	189,33 ± 21,61	218,67 ± 42,12	Det.-Limit 25,oo ng/ml

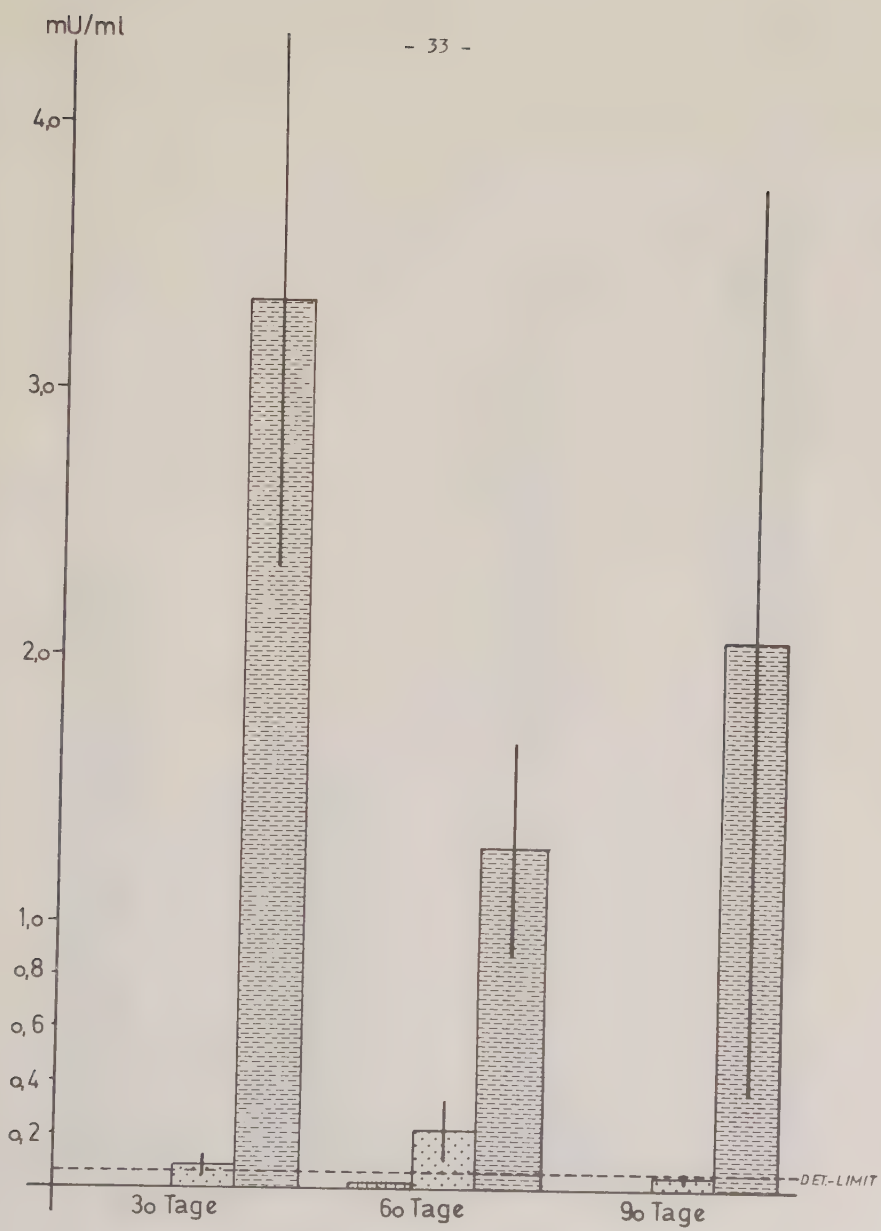

Abb. 1 AK gegen Rinderinsulin

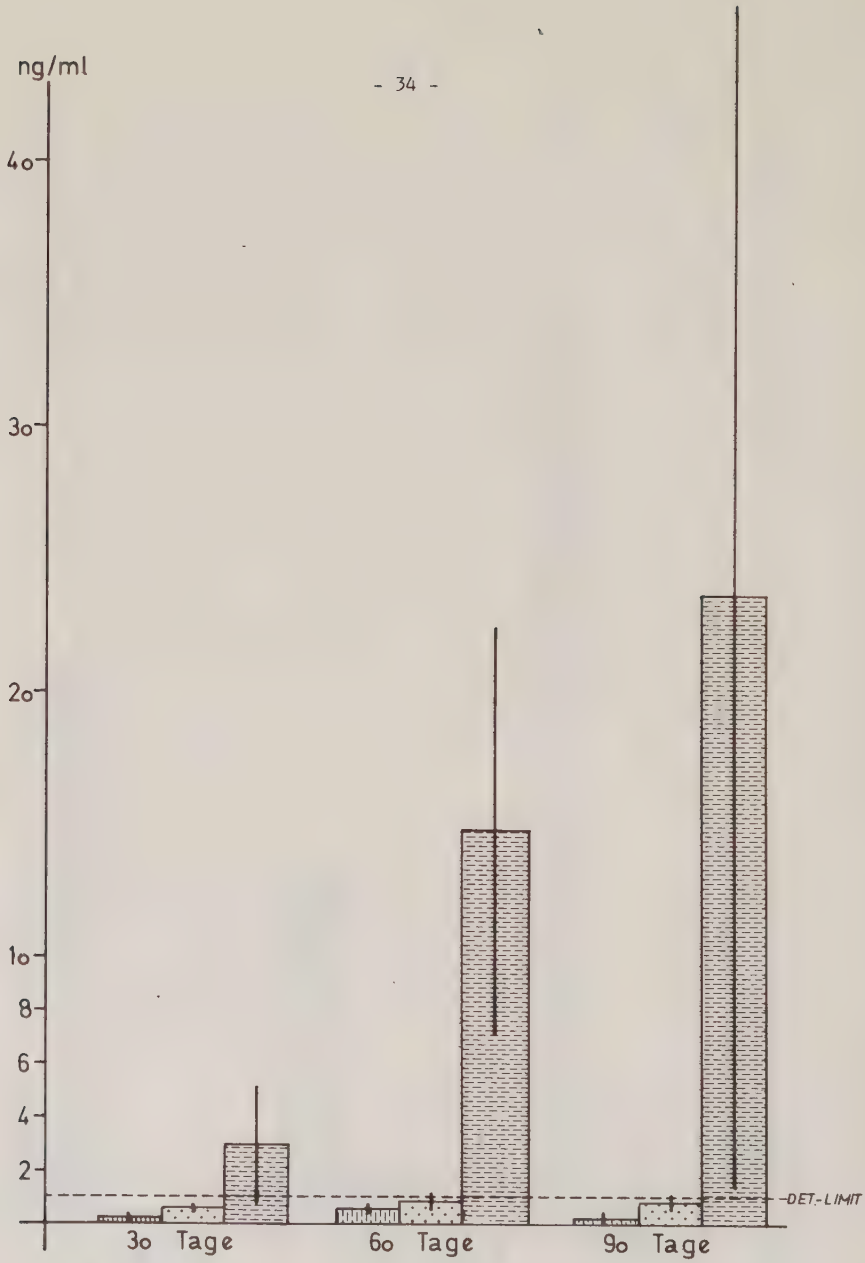

Abb. 2 AK gegen Schweine-PP

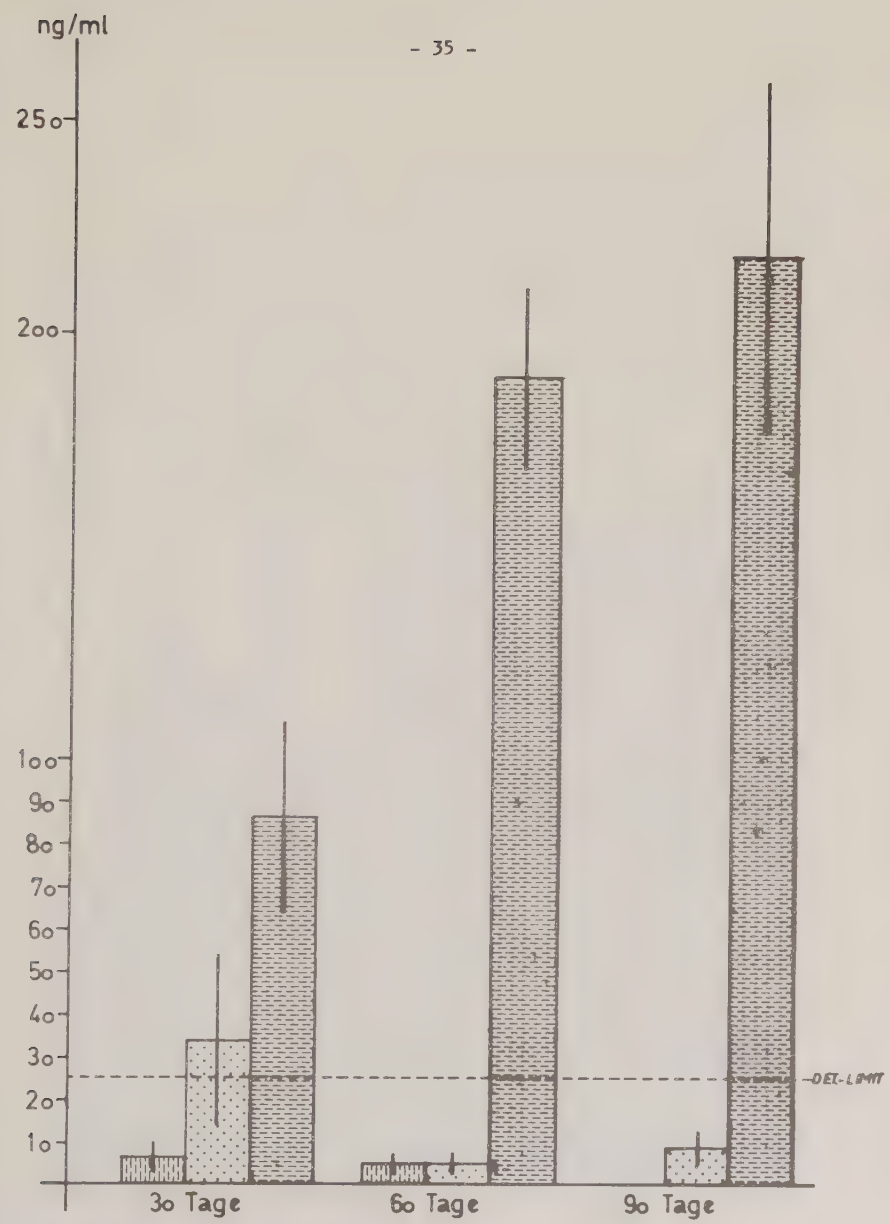

Abb. 3 AK gegen a-Komponente

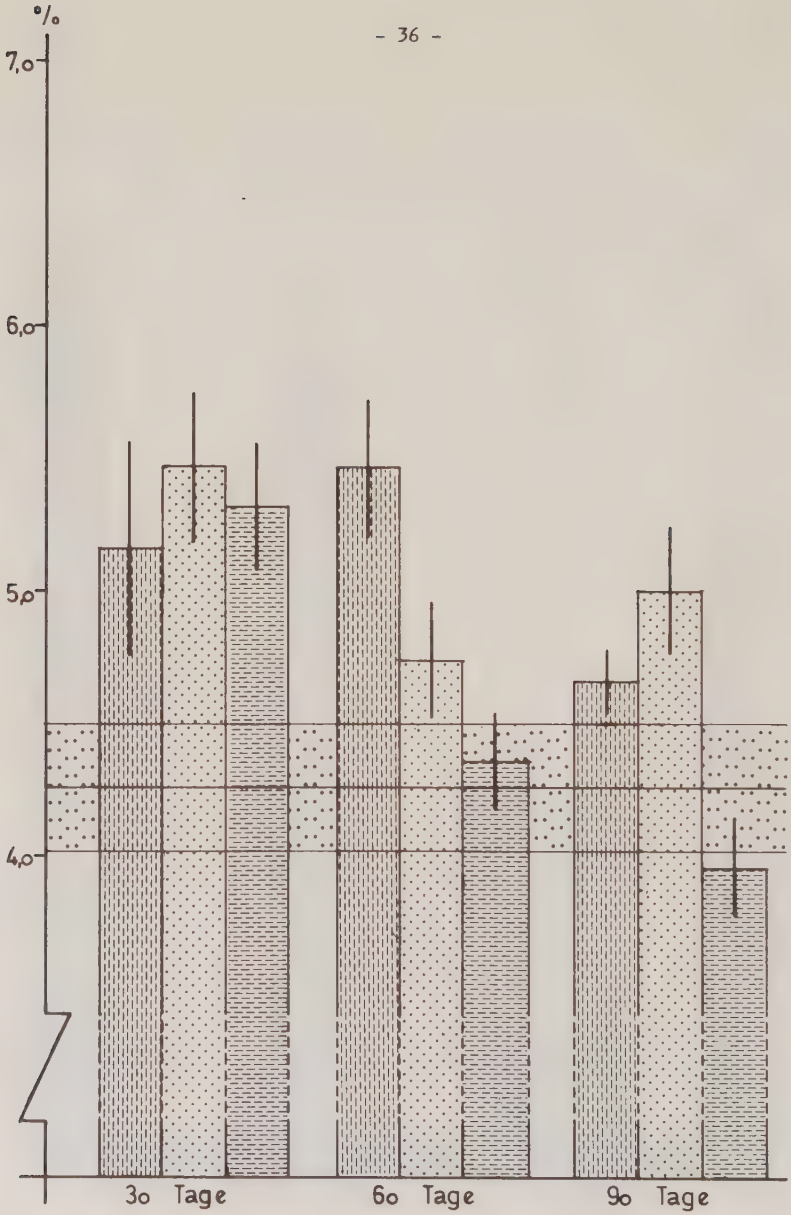

Abb 4 Mesangiumfläche %

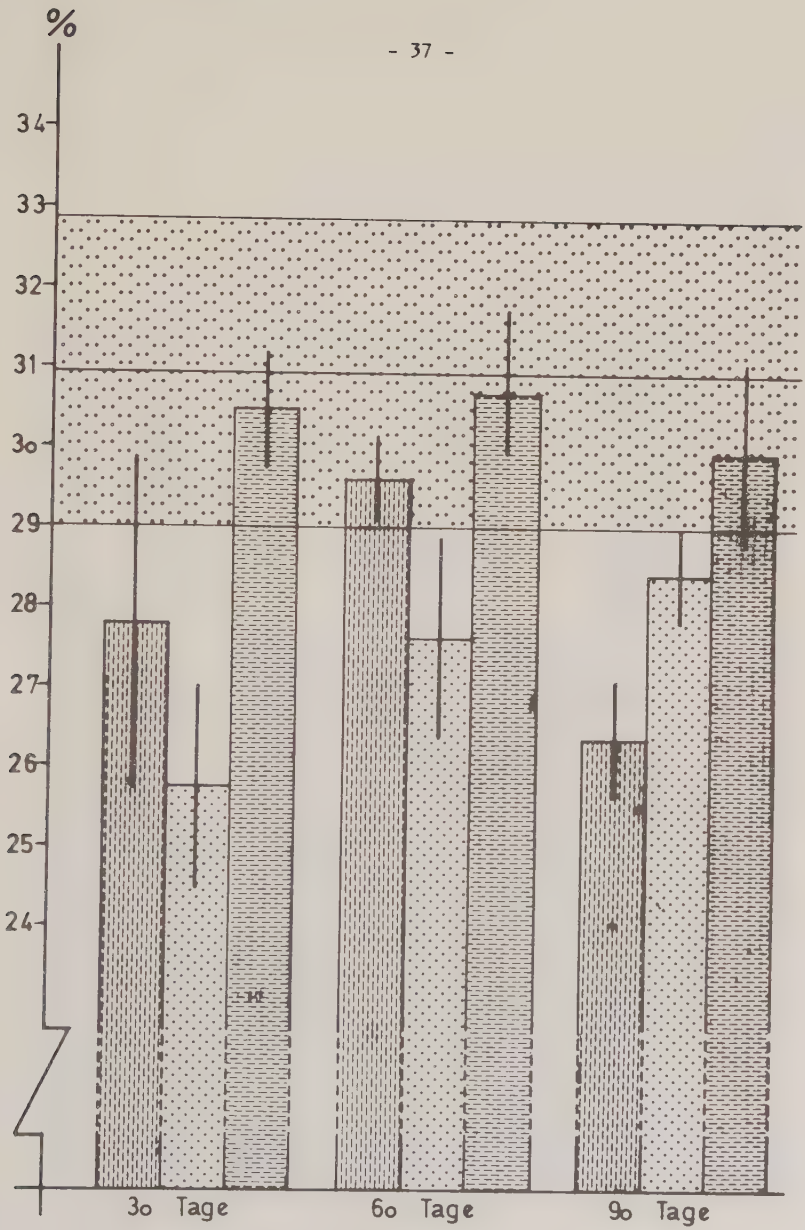

Abb. 5 Mesangiumzellen %

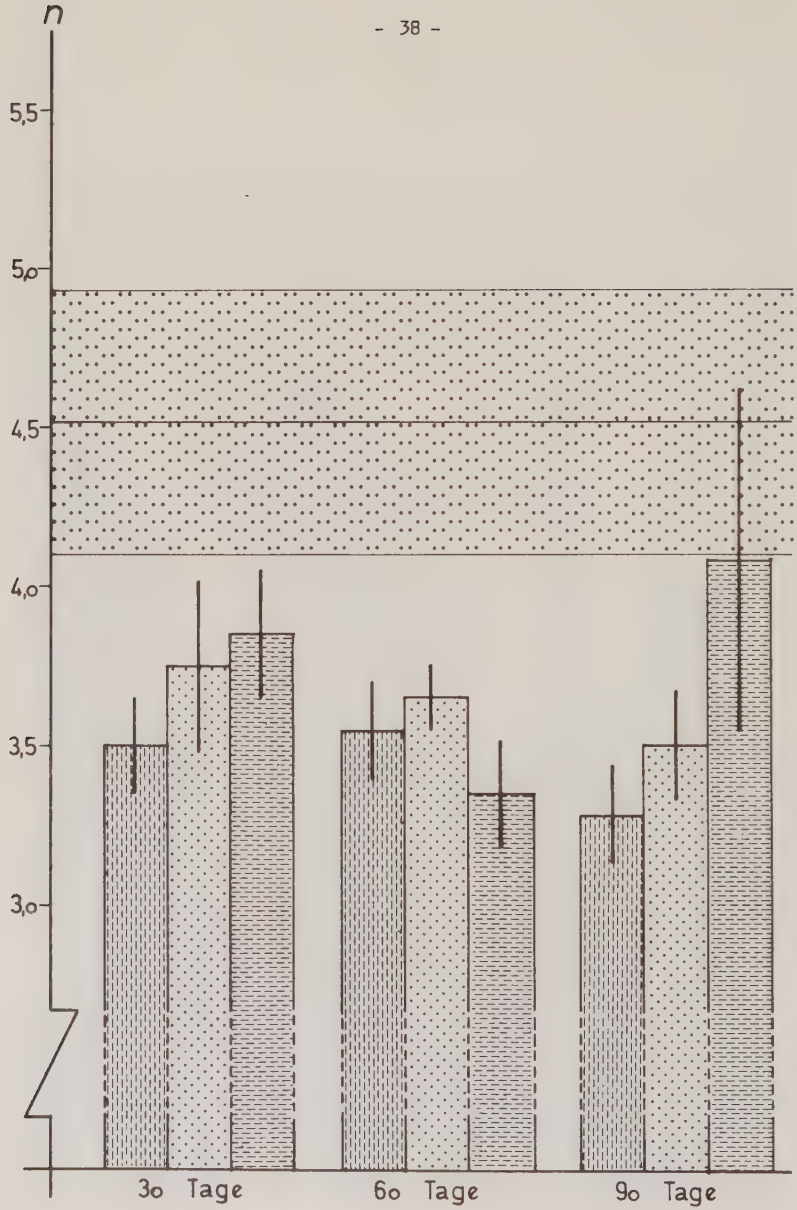

Abb. 6 Mes.-Zellzahl / 100µ² Mes.-Fläche

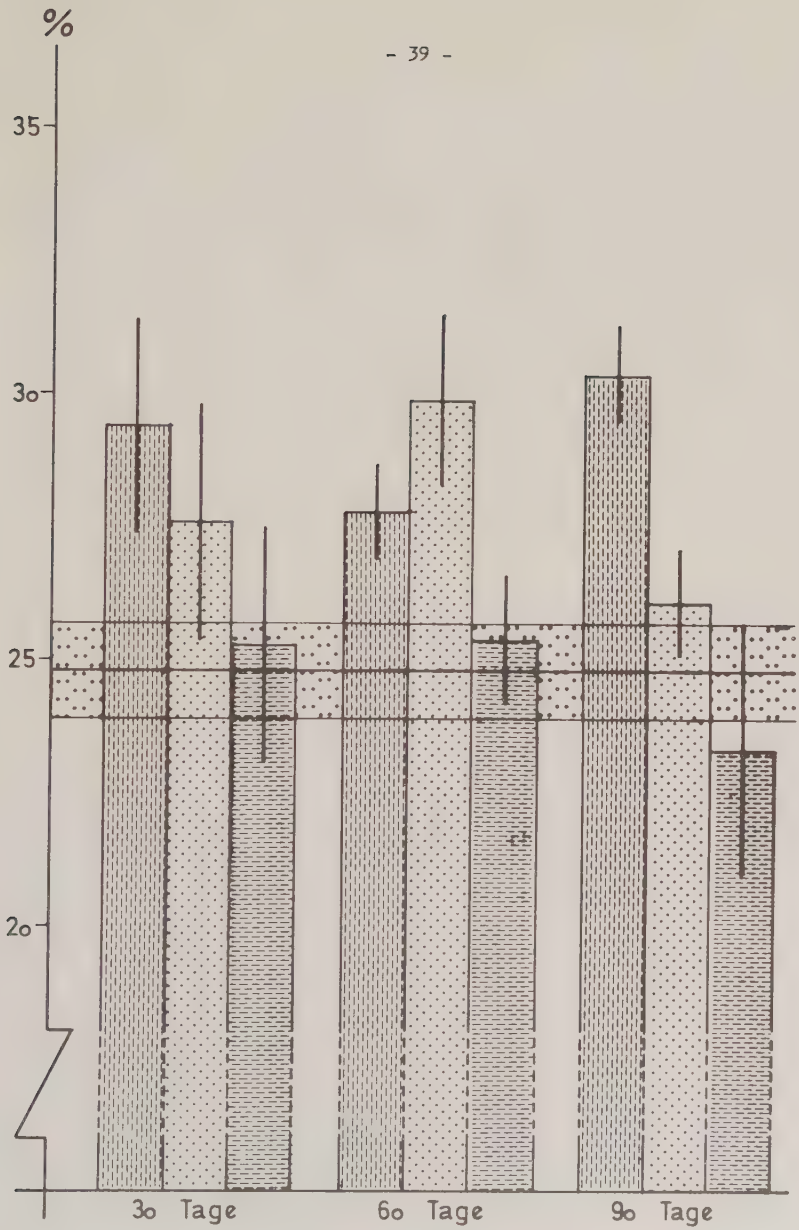

Abb. 7 Deckzellen %

7. Lebenslauf

Am 2o.Juli 1949 wurde ich, Hans Thomas Eiche, als erster Sohn des Werner Eiche, selbständiger Kaufmann in Stuttgart, und seiner Ehefrau Ursula geb.Gruoner in Stuttgart-Degerloch geboren.

1956 - 196o	Besuch der Grundschule in Stuttgart-Degerloch
196o - 1968	Besuch des Karls-Gymnasiums in Stuttgart, wo ich am 3o.Mai 1968 die Reifeprüfung ablegte.
ab WS 68/69	Studium der Zahnheilkunde in Tübingen bis zum Vorphysikum im SS 69
ab Ws 69/7o	Studium der Medizin in Tübingen
WS 69/7o	Vorphysikum Medizin
SS 71	Physikum Medizin
ab WS 71/72	Studium der Medizin und der Zahnheilkunde in Tübingen
SS 72	Physikum Zahnmedizin
28.1.1975	Staatsexamen Medizin
22.9.1976	Staatsexamen Zahnmedizin

Von Oktober 1976 bis Dezember 1977 war ich als Medizinalassistent tätig, davon 4 Monate Chirurgie am Krankenhaus Bethesda in Stuttgart, 7 Monate am Pathologischen Institut des Kreiskrankenhauses Lahr (Leitender Arzt Prof.Dr.med.H.Wehner) und 4 Monate an der Medizinischen Universitätsklinik in Freiburg.

29.6.77 Promotion zum Dr.med.

Von Januar 1978 bis März 1979 Ableistung des Grundwehrdienstes als Zahnarzt in Karlsruhe und Stuttgart.

Seit April 1979 bin ich als Assistenzarzt an der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie des Katharinenhospitals in Stuttgart (Leitender Arzt Prof.Dr.Dr.H.Schüle) tätig.